

**Cel pracy:** Cytokiny o właściwościach prozapalnych, immunoregulatorowych, proonkogennych i prometastatycznych, wydzielane przez komórki układu odpornościowego oraz komórki nowotworowe, sprzyjają progresji choroby nowotworowej. Celem pracy była ocena wydzielania wybranych cytokin prozapalnych i regulatorowych, oznaczonych we krwi obwodowej u osób z rakiem krtani, w aspekcie ich zastosowania jako biomarkerów fenotypu większej agresywności guza.

**Materiał i metody:** Analizą objęto grupę 106 osób, w tym 55 chorych ze zwerfikowanym rakiem płaskonabłonkowym krtani. W patomorfologicznej ocenie zaawansowania zmian (głębokość i sposób inwazji nowotworowej) uwzględniono kryteria klasyfikacji oceny zmian we froncie guza (*tumour front grading* – TFG). Stężenia cytokin, takich jak interleukiny (IL-6, IL-8 i IL-10), czynnik martwicy nowotworów (*tumour necrosis factor* – TNF), interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) we krwi obwodowej chorych, oceniano w dwóch punktach czasowych (21 godz. i 72 godz.) metodą immunoenzymatyczną ELISA. Zestawiono wyniki badań immunologicznych i kliniczno-morfologicznych.

**Wyniki:** Analiza wyników przeprowadzonych badań wykazała, że w rakach krtani charakteryzujących się największą rozległością miejscową pT4 obserwowano znamienne najmniejsze wydzielanie IL-6 i IFN- $\gamma$  oraz największe wydzielanie TNF. W guzach nowotworowych o największej głębokości inwazji, z naciekaniami warstwy *lamina propria* oraz chrząstki krtani stwierdzono znamienne najmniejsze stężenia IL-6 i IFN- $\gamma$ . W rakach krtani, które charakteryzowały się dobrze odgraniczonymi marginesami nacieku, stwierdzono znamienne największe stężenia IL-6 i IL-10.

**Wnioski:** Przeprowadzone badania wskazują na znaczenie aktywności cytokin w przebiegu choroby nowotworowej jako biomarkerów fenotypu zaawansowania i progresji zmian.

**Słowa kluczowe:** rak krtani, cytokiny prozapalne i regulatorowe, głębokość i typ inwazji.

## Ocena wydzielania cytokin prozapalnych i regulatorowych oraz ich związku z głębokością i typem naciekania zmian nowotworowych u osób z rakiem krtani

*Secretion of inflammatory and regulatory cytokines and the association with depth and type of tumour invasion in patients with cancer of the larynx*

Katarzyna Starska<sup>1</sup>, Iwona Lewy-Trenda<sup>2</sup>, Jan Woś<sup>3</sup>, Paweł Papież<sup>3</sup>, Ewa Głowacka<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Otolaryngologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>2</sup>Katedra Patomorfologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>3</sup>Oddział Laryngologii Szpitala im. Żeromskiego w Krakowie

<sup>4</sup>Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

### Wstęp

Jedną z najistotniejszych kwestii współczesnej onkologii nowotworów regionu głowy i szyi (*head and neck squamous cell carcinomas* – HNSCC), w szczególności raka płaskonabłonkowego krtani, jednego z najczęstszych guzów tego regionu, jest znalezienie obiektywnych biomarkerów agresywności nowotworu, które umożliwiłyby wskazanie fenotypu związanego z większą inwazyjnością guza. Zdefiniowanie biologicznych wskaźników, jednoznacznych w ocenie i interpretacji, pozwoliłoby w praktyce na wyodrębnienie grup chorych z nowotworami charakteryzującymi się nasiloną progresją zmian, a tym samym na wybór właściwego i optymalnego leczenia, jak też prognozowania w konkretnych przypadkach HNSCC. W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć prace, w których autorzy wskazują na rolę wielu biomarkerów związanych m.in. z regulacją cyklu komórkowego, p27kip1, Skp2, Ki67, jako potencjalnych wskaźników inwazyjności zmian, determinujących rokowanie oraz wybór właściwego postępowania terapeutycznego [1–6]. Wśród publikacji dotyczących tego tematu można jednak wskazać prace, które nie potwierdzają roli wspomnianych wykładników jako niezależnych wskaźników agresywności wzrostu nowotworu i czynników o znaczeniu prognostycznym [7–9]. Rozbieżności w sformułowanych wnioskach powodują, że nadal prowadzi się liczne badania nad znalezieniem biomarkerów będących jednoznaczными indykatorami nasilenia zmian nowotworowych, które można by wykorzystać w praktyce onkologicznej.

W światowym piśmiennictwie liczni badacze wskazują na znaczącą rolę badań nad zaburzeniami układu odpornościowego w przebiegu choroby nowotworowej [10–22]. Dokładne poznanie i zrozumienie mechanizmów tych zaburzeń stwarza szansę na wskazanie immunologicznych wykładników związanych z klinicznym przebiegiem choroby, na podstawie których można by oceniać stopień inwazyjności zmian nowotworowych i podejmować właściwe decyzje terapeutyczne. W ostatnich latach liczne ośrodki prowadzą wielokierunkowe badania doświadczalne i kliniczne nad mechanizmami regulacyjnymi determinującymi aktywność komórek układu odpornościowego w odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowo-

**Background:** Pro-inflammatory, immunoregulatory, pro-metastatic and pro-oncogenic cytokines, secreted by cells of the immune system and cancer cells, promote tumour progression. The aim of this study was to evaluate the release of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines, marked in the peripheral blood of patients with laryngeal carcinoma, in terms of their application as a biomarker of more aggressive tumour phenotype.

**Material and methods:** We analysed a group of 106 people, including 55 patients with verified squamous cell carcinoma of the larynx. In the pathomorphological assessment of tumour stage (depth and type of tumour invasion) we took into account the classification criteria for assessing changes in the most aggressive part of the neoplasm, tumour front grading (TFG). Concentrations of cytokines IL-6, IL-8, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  in the peripheral blood of patients was assessed at two time points (21 h and 72 h) by ELISA. Immunological and clinicomorphological outcomes were correlated and summarized.

**Results:** Analysis of test results showed that in laryngeal carcinomas with the highest extent of local pT4 there was observed the lowest secretion of IL-6 and IFN- $\gamma$  and the greatest secretion of TNF. Tumours with the greatest depth of invasion with infiltration of the lamina propria and the cartilage of the larynx had significantly lower levels of IL-6 and IFN- $\gamma$ . Carcinomas of the larynx characterized by good margins of infiltration had the highest concentrations of IL-6 and IL-10.

**Conclusions:** The study indicates the importance of the activity of cytokines as biomarkers of phenotype severity and progression in patients with laryngeal carcinoma.

**Key words:** laryngeal carcinoma, proinflammatory and regulatory cytokines, depth and mode of invasion.

dwuramym róónnego pochodzenia. Badania nad tymi zagadnieniami staj się obecnie wiodce w immunopatologii klinicznej i wyznaczaj kierunek poszukiwa dla wskazania immunologicznych markerów agresywności nowotworu [15, 18, 19, 23–32].

Cytokiny wydzielane przez komórki biorące udział w procesach immunologicznych odgrywają bardzo wzn rolę w zjawiskach odporności przeciwnowotworowej. Do tej grupy zaliczane są interleukiny (IL), w tym cytokiny o wlasciwociach prozapalnych (IL-6 i IL-8) oraz immunosupresyjnych (IL-10), interferony (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  i IFN- $\gamma$ ), czynnik martwicy nowotworu (*tumour necrosis factor* – TNF) oraz czynniki wzrostu (GM-CSF). Znaczenie tych czynników w onkologii klinicznej opiera się na ich róónnorodnych wlasciwociach modyfikowania odpowiedzi immunologicznej. Najczciej wskazywanymi cytokinami, które mogą mieć znaczenie w przebiegu choroby nowotworowej, są interleukiny o wlasciwociach prozapalnych IL-6 i IL-8 oraz cytokiny IL-10 i TGF- $\beta$  o działaniu regulatorowym i immunosupresyjnym [19, 21, 23, 33–35]. Prozapalne cytokiny IL-6 i IL-8 wydzielane przez komórki nowotworowe, określane jako czynniki promujące kancerogenez i wzrost guza nowotworowego, oraz cytokiny o wlasciwociach proonkogennych i prometastatycznych sprzyjają w szczegóólny sposób progresji choroby nowotworowej, w tym HNSCC [18, 23, 35–38].

Celem pracy była ocena steóó wybranych cytokin prozapalnych i regulatorowych, tj. IL-6, IL-8, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , oznaczonych we krwi obwodowej u chorych na raka skonabtonkowego krtani w aspekcie ich zastosowania jako biomarkerów fenotypu większej agresywności guza nowotworowego określonej na podstawie oceny gbokoci i sposobu inwazji guza nowotworowego.

## Materiał i metody

### Grupa badana

Analiz objęto grup 106 osóó, w tym 55 chorych ze zweryfikowanym rakiem skonabtonkowym krtani, leczonych chirurgicznie w Klinice Laryngologii Onkologicznej I Katedry Laryngologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, w latach 2003–2007. Grup badaną stanowiło 53 móóczyzn (96,4%) i 2 kobiety (3,6%) w wieku 47–83 lat (rednia wieku 58,3 roku). W badanej grupie chorych u 33 (60%) pacjentów przeprowadzono całkowite usunięcie krtani, a u 22 (40%) – czsciowe usunięcie krtani. U 22 chorych (40%) z potwierdzonymi badaniem śródoperacyjnym powiększonymi wóóami chłonnymi wykonano ponadto operacj usunięcia wóóów chłonnych regionu szyi, w tym u 20 (36,4%) selektywną operacj wóóów chłonnych i u 2 (3,6%) radykalną operacj wóóow w modyfikacji Crile’a-Jawdyskiego.

Kryteriami wlczenia do grupy badanej były: potwierdzony w badaniu patomorfologicznym rak skonabtonkowy krtani, przeprowadzenie leczenia chirurgicznego jako pierwszej metody postępowania leczniczego, bez stosowania wcześniej innej terapii (immunosupresji, radio- lub chemioterapii) oraz brak obecności przerzutów odległych. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgod Komisji Bioetyki UM w Łodzi (numer RNN/15/03/KN). Wszyscy uczestnicy badań osobiście wyrazili świadomą pisemną zgod na udział w nich.

Grupa kontrolna, którą stanowili zdrowi ochotnicy dobrani pod względem wieku do grupy badanej, skadala się z 51 osóó: 41 móóczyzn (80,4%) i 10 kobiet (19,6%), w wieku 38–84 lat (rednia wieku 57,4 roku).

### Ocena patomorfologiczna

W przeprowadzonej analizie patomorfologicznej stopień zaawansowania miejscowego zmian nowotworowych określono zgodnie z kryteriami klasyfikacji TNM dla HNSCC (UICC 2003). W ocenie gbokoci i typu inwazji nowotworowej uwzględniono skal zaawansowania zmian morfologicznych we fronce nacieku nowotworowego, tj. w jego najbardziej inwazyjnej i najmniej róónicowanej czci, zgodnie z kryteriami klasyfikacji *tumour front grading* (TFG) [39]. Preparaty barwione hemoksylin i eozyn (H&E) oceniano w mikroskopie świetlnym Olympus AX60, w 5 polach widzenia (w pow. 200 $\times$ ), kierując się miejscami

o najgłębszym naciekanii do otaczających tkanek. Według kryteriów klasyfikacji TFG w ocenie głębokości inwazji uwzględniono następujące stopnie zaawansowania zmian: *carcinoma in situ*, mikroinwazja podśluzówkowa, guzkowy naciek podśluzówkowy oraz głęboka inwazja ściany. Sposób naciekania ustalono, stosując następujący podział zmian: dobrze odgraniczone marginesy, nacieki litymi sznurami i wstęgami, nacieki małymi grupami (< 15 komórek) oraz naciekanie pojedynczymi komórkami. Charakterystykę kliniczno-morfologiczną grupy badanej przedstawiono w tabeli 1.

### Ocena wydzielania cytokin pozapalnych i regulatorowych IL-6, IL-8, TNF, IFN- $\gamma$ i IL-10

Krew żylną pobierano do próbki zawierającej heparynę litową (stężenie końcowe 10 j.m./ml), rozcieńczano w płynie hodowlanym RPMI-1640 (Biomed, Lublin, Poland) zawierającym 10% v/v zinaktywowanej płodowej surowicy cielęcej FCS (Biochrom AG Seromed, Berlin, Germany), 100 j.m./ml penicyliny i 100  $\mu$ g/ml streptomycyny (Sigma, USA), tak by uzyskać gęstość  $1 \times 10^6$  komórek/ml. W celu oceny generacji cytokin: IL-6, IL-8, TNF, IFN- $\gamma$  i IL-10, próbki wirowano (2000 obrotów/min przez 10 min) i zbierano nasącz w 21. godz. i 72. godz. hodowli komórkowej. Stężenia cytokin oceniano metodą immunoenzymatyczną ELISA, przy użyciu zestawów dla oceny ludzkiej IL-6 (czułość 2,2 pg/ml), IL-8 (czułość 2 pg/ml), TNF (czułość 2 pg/ml), IFN- $\gamma$  (czułość 1 pg/ml), IL-10 (czułość 2 pg/ml) ELISA SET BD Opt EIA (San Diego, USA). Absorbancję badanych próbek odczytywano przy fali długości 450 nm (czytnik EL<sub>x</sub>808) (Bio-Tek Instruments, USA).

### Analiza statystyczna

Ocenę statystyczną zebranych danych przeprowadzono za pomocą programu STATISTICA 5.0 (StatSoft, Inc. USA). Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (test ANOVA rang Kruskala-Wallis) wraz z testem jednorodności wariancji (test Levene'a) oraz testami porównań wielokrotnych (*post-hoc* test Bonferroni-Dunneta) dla porównywania średnich wartości cech w badanych grupach. Dla wszystkich stosowanych testów przyjęto poziom istotności  $p \leq 0,05$ .

### Wyniki

#### Analiza wydzielania wybranych cytokin: IL-6, IL-8, TNF, IFN- $\gamma$ i IL-10, w grupie badanej i kontrolnej

Analiza danych wykazała znamienne zmniejszone średnie stężenie IFN- $\gamma$  w nadsączach z krwi pełnej, ocenionych w 21. godz. doświadczenia, w grupie chorych na raka płaskonabłonkowego krtani w porównaniu z wartościami stężeń tej cytokiny w grupie kontrolnej ( $p = 0,02$ ). Nie odnotowano różnic istotnych statystycznie między wartościami średnich stężeń IL-6, IL-8, TNF i IL-10 w badanych grupach. Pomimo braku znamienych różnic dla średnich wartości stężeń IL-6, IL-8, TNF i IL-10 między grupą badaną i kontrolną, ocena stężeń cytokin wykazała występowanie zauważalnych tendencji: średnie wartości stężeń IL-6, IL-8, TNF oraz IL-10 były mniejsze w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną. Zestawiając wyniki średnich wartości stężeń cytokin wygenerowanych w określonym czasie inkubacji (21. vs 72. godz.) w badanej grupie chorych, stwierdzono występowanie różnic istotnych statystycznie między wartościami

**Tabela 1.** Kliniczno-morfologiczna charakterystyka badanej grupy chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani

**Table 1.** Clinico-morphological characteristics of the study group of patients with squamous cell carcinoma of the larynx

Cecha	Liczebność grupy n (%)
płeć:	
mężczyźni	53 (96,4)
kobiety	2 (3,6)
leczenie chirurgiczne:	
częściowe usunięcie krtani	22 (40,0)
całkowite usunięcie krtani	33 (60,0)
operacja usunięcia węzłów chłonnych szyi	22 (40,0)
selektywna operacja węzłowa (SND)	20 (36,4)
radikalna operacja węzłowa (RND)	2 (3,6)
pT:	
pT2	14 (25,4)
pT3	21 (38,2)
pT4	20 (36,4)
pN:	
pN0	39 (70,9)
pN1-3	16 (29,1)
pN1	7 (12,7)
pN2	4 (7,3)
pN3	5 (9,1)
zróżnicowanie histopatologiczne (G):	
G1	4 (7,3)
G2	44 (80,0)
G3	7 (12,7)
typ inwazji:	
dobrze odgraniczone marginesy	12 (21,8)
nacieki litymi sznurami i wstęgami	15 (27,3)
nacieki małymi grupami (< 15 komórek)	16 (29,1)
nacieki pojedynczymi komórkami	12 (21,8)
głębokość inwazji:	
<i>carcinoma in situ</i>	6 (10,9)
mikroinwazja podśluzówkowa	12 (21,8)
guzkowy naciek podśluzówkowy	18 (32,7)
głęboka inwazja ściany	19 (34,5)

stężeń dla każdej z analizowanych cytokin ( $p < 0,001$ ). Średnie wartości analizowanych cytokin w grupie badanej i kontrolnej przedstawiono w tabeli 2.

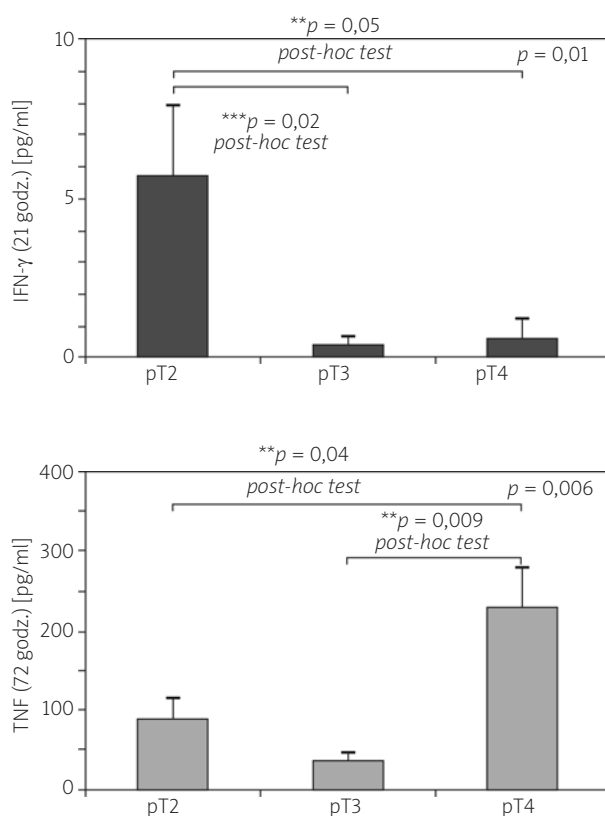
#### Analiza wydzielania wybranych cytokin w zależności od cech klasyfikacji pTNM i cechy G

Analiza danych wykazała istotne statystycznie różnice wartości średniego stężenia IL-6 w nadsączach krwi pełnej, w układach badawczych ocenionych w 21. godz. inkubacji, w zależności od rozległości miejscowej guza nowotworowego – pT ( $p = 0,02$ ). W testach *post-hoc* wykazano, że guzy w wysokim stadium zaawansowania miejscowego (pT4) charakteryzowały się znamienne statystycznie mniejszymi wartościami średniego stężenia IL-6 ( $*p = 0,02$  dla pT3 vs pT4). W analizowanych układach badawczych stwierdzono również istotne różnice wartości średniego stężenia IFN- $\gamma$  w zależności od cechy pT ( $p = 0,01$ ). W testach *post-hoc* wykazano, że raki krtani pT2 charakteryzowały się istotnie statystycznie większymi wartościami średniego stężenia

**Tabela 2.** Stężenia cytokin prozapalnych i regulatorowych w grupie badanej i kontrolnej  
**Table 2.** Concentrations of proinflammatory and regulatory cytokines in the study group and control

Grupa	t (godz.)	Cytokiny				
		IL-6 ± SEM [ng/ml]	IL-8 ± SEM [ng/ml]	TNF ± SEM [pg/ml]	IFN-γ ± SEM [pg/ml]	IL-10 ± SEM [pg/ml]
badana n = 55	21.	63,1 ± 7,05	105,9 ± 11,25	345,3 ± 39,38	2,3 ± 0,87*	630,5 ± 72,92
	72.	136,9 ± 29,89	292,4 ± 42,12	132,2 ± 28,11	2,0 ± 0,76	556,4 ± 107,08
kontrolna n = 51	21.	57,7 ± 7,03	169,2 ± 50,69	396,9 ± 63,48	6,1 ± 2,31*	650,9 ± 109,62
	72.	141,3 ± 26,53	342,7 ± 47,65	141,9 ± 17,84	7,7 ± 2,91	580,2 ± 82,70

\*Istotne statystycznie różnice stężeń IFN-γ w grupie badanej i kontrolnej  $p = 0,02$



**Ryc. 1.** Stężenie IFN-γ i TNF w badanej grupie chorych w zależności od rozległości miejscowej zmian nowotworowych (pT)

**Fig. 1.** IFN-γ and TNF in the study group depending on the extent of local tumor (pT)

IFN-γ w porównaniu z guzami pT3 i pT4 (\*\* $p = 0,05$  dla pT2 vs pT4, \*\*\* $p = 0,02$  dla pT2 vs pT3). Ocena statystyczna danych wykazała również znamienne statystycznie różnice wartości średniego stężenia IL-6 w nadsączach krwi pełnej ocenionych w 72 godz. inkubacji dla różnego stopnia rozległości miejscowej guza nowotworowego pT ( $p = 0,03$ ). We krwi obwodowej chorych z rakami krtani o większej rozległości zmian występowały mniejsze wartości stężeń IL-6. W analizowanych układach badawczych stwierdzono także istotne różnice wartości średniego stężenia TNF w zależności od cechy pT ( $p = 0,006$ ). W testach *post-hoc* wykazano, że raki krtani pT4 charakteryzowały się istotnie statystycznie wyższymi wartościami średniego stężenia TNF

w porównaniu z guzami pT2 i pT3 (\* $p = 0,04$  dla pT2 vs pT4, \*\* $p = 0,009$  dla pT2 vs pT3). Dla cechy pN oraz histologicznego zróżnicowania guza (G) nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności ( $p > 0,05$ ). Wartości średniego stężenia badanych cytokin oraz wyniki analizy statystycznej w zależności od cechy pT przedstawiono na rycinie 1.

#### Analiza wydzielania wybranych cytokin prozapalnych i regulatorowych w zależności od głębokości nacieku nowotworowego

Ocena statystyczna danych wykazała istotne różnice wartości średniego stężenia IL-6 w nadsączach krwi pełnej, w układach badawczych ocenionych w 21. godz. inkubacji, w zależności od głębokości inwazji nacieku nowotworowego ( $p = 0,03$ ). W testach *post-hoc* wykazano, że raki krtani naciekające głęboko otaczające tkanki, z inwazją chrząstki, charakteryzowały się znamienne statystycznie niższymi wartościami średniego stężenia IL-6 w porównaniu z guzami charakteryzującymi się mikroinwazją podśluzówkową (\* $p = 0,04$ ). W analizowanych układach badawczych stwierdzono także istotne zależności średniego stężenia IFN-γ od głębokości nacieku nowotworowego ( $p = 0,03$ ). W testach *post-hoc* wykazano, że najgłębiej naciekające raki krtani charakteryzowały się znamienne niższymi wartościami średniego stężenia IFN-γ w porównaniu z guzami nowotworowymi CIS (\*\* $p = 0,03$ ). Analiza statystyczna stężeń badanych cytokin oznaczonych w nadsączach krwi pełnej, w układach badawczych ocenionych w 72 godz. inkubacji, w zależności od głębokości inwazji nacieku nowotworowego nie wykazała istotnych statystycznie zależności ( $p > 0,05$ ). Wartości średniego stężenia cytokin oraz wyniki analizy statystycznej w zależności od głębokości inwazji przedstawiono w tabeli 3.

#### Analiza wydzielania wybranych cytokin prozapalnych i regulatorowych w zależności od typu inwazji

Ocena statystyczna danych wykazała istotne różnice wartości średniego stężenia IL-6 w nadsączach krwi pełnej, w układach badawczych ocenionych w 21. godz. inkubacji, w zależności od typu inwazji nacieku nowotworowego ( $p = 0,02$ ). W testach *post-hoc* wykazano, że raki krtani naciekające otaczające tkanki z zachowaniem dobrze odgraniczonych marginesów nacieku charakteryzowały się znamienne wyższymi wartościami średniego stężenia IL-6 w porównaniu z guzami naciekającymi litymi sznurami i wstęgami (\* $p = 0,02$ ). Analiza danych wykazała również istotne statystycznie różnice wartości średniego stężenia IL-10 w nadsączach



**Tabela 3.** Stężenia cytokin prozapalnych i regulatorowych w zależności od głębokości inwazji**Table 3.** Concentrations of proinflammatory and regulatory cytokines, depending on the depth of invasion

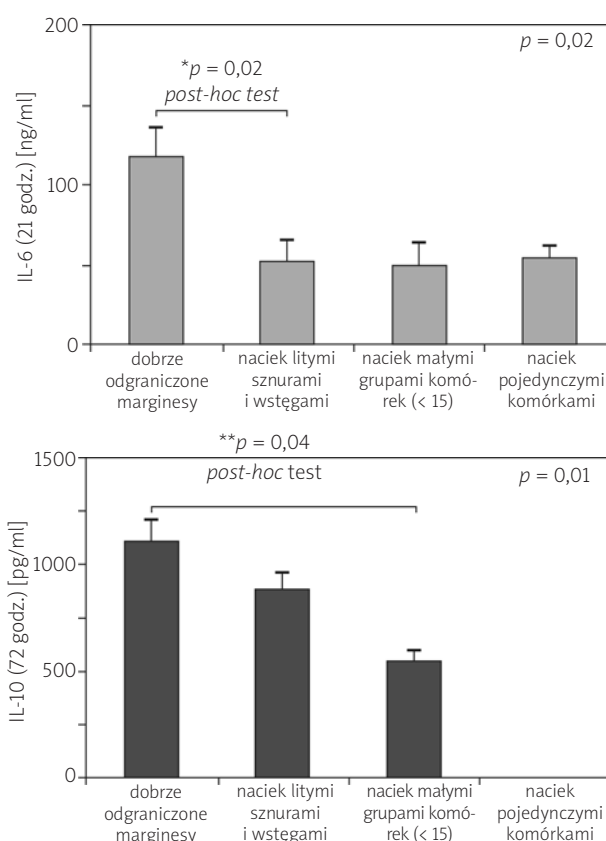
Cytokina						
Głębokość zmian	t (godz.)	IL-6 ± SEM [ng/ml]	IL-8 ± SEM [ng/ml]	TNF ± SEM [pg/ml]	IFN-γ ± SEM [pg/ml]	IL-10 ± SEM [pg/ml]
carcinoma in situ	21.	56,4 ±18,88	106,8 ±17,72	432,2 ±112,3	8,2 ±4,31**	387,3 ±80,85
	72.	156,6 ±24,67	206,8 ±88,20	112,3 ±77,60	0,0 ±0,0	232,4 ±82,40
mikroinwazja podśluzówkowa	21.	82,5 ±13,86*	132,1 ±34,98	360,5 ±69,4	1,6 ±0,99	662,2 ±53,27
	72.	185,7 ±33,33	194,9 ±48,73	69,4 ±39,45	0,0 ±0,0	243,8 ±41,96
guzkowy nacieki podśluzówkowy	21.	78,3 ±14,07	96,5 ±12,63	332,5 ±102,3	1,6 ±1,43	608,7 ±79,64
	72.	228,1 ±80,73	403,3 ±89,56	102,3 ±47,60	8,1 ±6,8	728,0 ±111,86
głęboka inwazja ściany	21.	34,7 ±7,41*	90,1 ±13,64	299,5 ±181,1	0,5 ±0,56**	493,0 ±83,34
	72.	60,0 ±15,36	293,1 ±68,53	181,1 ±50,21	0,4 ±0,4	516,3 ±206,42

\*Istotne statystycznie różnice stężeń IL-6: \* $p = 0,04$  (mikroinwazja vs głęboka inwazja); IFN-γ: \*\* $p = 0,03$  (CIS vs głęboka inwazja) w testach post-hoc

krwi pełnej, w układach badawczych ocenionych w 72. godz. inkubacji, w zależności od typu inwazji ( $p = 0,001$ ). W testach post-hoc wykazano, że raki krtani naciekające małymi grupami komórek (< 15 komórek) charakteryzowały się istotnie statystycznie niższymi wartościami średniego stężenia IL-10 w porównaniu z guzami z dobrze odgraniczonymi marginesami nacieku (\*\* $p = 0,04$ ). Ocena danych wykazała ponadto istotne statystycznie różnice wartości średniego stężenia IFN-γ w analizowanych układach badawczych w 72. godz. inkubacji, w zależności od typu inwazji ( $p = 0,04$ ). Dla TNF nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności średnich stężeń od rozległości miejscowej guza nowotworowego ( $p > 0,05$ ). Wartości średniego stężenia cytokin w zależności od typu inwazji przedstawiono na rycinie 2.

## Dyskusja

Niezmiernie istotnym z punktu widzenia klinicznego elementem pracy było zestawienie uzyskanych wyników badań immunologicznych z analizą kliniczno-histopatologiczną materiału biologicznego pochodzącego od chorych na raka płaskonabłonkowego krtani w aspekcie praktycznego wykorzystania wyników przeprowadzonych badań. Szersze poznanie i zrozumienie mechanizmów regulacji odpowiedzi immunologicznej w powiązaniu ze stanem klinicznym chorych, po ostrożnej próbie tącznej interpretacji uzyskanych wyników oceny immunologiczno-kliniczno-morfologicznej, pozwoliły na podjęcie próby klinicznego przełożenia rezultatów przeprowadzonej analizy w konkretnych przypadkach raka płaskonabłonkowego krtani. W przedstawionej pracy wyniki badań wykładników procesów immunologicznych zestawiono z kryteriami klasyfikacji pTNM, stopniem zróżnicowania histopatologicznego zmian oraz szczegółowo przeanalizowano głębokość i sposób naciekania nowotworu w najbardziej inwazyjnej i najmniej zróżnicowanej części nacieku, zgodnie z kryteriami klasyfikacji TFG. Wyników przeprowadzonej wielokierunkowej analizy nie można bezpośrednio porównywać z wynikami innych autorów. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono publikacji, których przedmiotem byłaby ocena badanych wykładników komórkowej odpowiedzi immunologicznej w raku płaskonabłonkowym krtani, w kontekście tak szczegółowej analizy wybranych cech nacieku nowotworowego. Prace nauko-



**Ryc. 2.** Stężenie IL-6 i IL-10 w analizowanej grupie chorych w zależności od typu inwazji nowotworowej

**Fig. 2.** The concentration of IL-6 and IL-10 in the study group, depending on the type of tumor invasion

we dotyczące niejednorodnych grup raków regionu głowy i szyi, w których analizowano związki między zjawiskami immunologicznymi i cechami kliniczno-morfologicznymi guza nowotworowego, dotyczyły wyłącznie typowych wykładników histopatologicznych, tzn. kryteriów klasyfikacji TNM i stopnia klinicznego zaawansowania choroby (S), które nie pozwalają na jednoznaczną ocenę stopnia agresywności i inwazyjności nacieku, a tym bardziej nie stanowią wystarczającego i samodzielnego wskaźnika zaawansowania procesu nowotworowego [16, 33, 36, 40–45]. Do

dyskusji wybrano te publikacje, w których autorzy analizowali wybrane wykładniki odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego w odniesieniu do cech morfologicznych guzów nowotworowych u pacjentów z HNSCC, ze zbliżonym do analizowanej grupy profilem klinicznym.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono silną zależność wydzielania wybranych cytokin prozapalnych i regulatorowych we krwi obwodowej od klinicznego zaawansowania choroby nowotworowej. Uzyskane wyniki wskazują pośrednio na występowanie złożonych interakcji i zależności międzykomórkowych, będących wynikiem zaburzeń mechanizmów regulacyjnych komórkowej odpowiedzi immunologicznej na obecność antygenów nowotworowych. Wyniki badań wskazują na występowanie supresji autologicznych komórek współuczestniczących w reakcjach immunologicznych oraz zjawiska tolerancji w przebiegu zaawansowanego klinicznie raka krtani. Dowodzą tego znamienne zmniejszające się wartości stężeń IL-6 i IFN- $\gamma$ , oznaczonych we krwi obwodowej, wraz ze wzrostem inwazyjności i agresywności procesu nowotworowego, co może być pośrednim wskaźnikiem zmniejszającej się aktywności komórek układu odpornościowego, pomimo silnej stymulacji tych komórek przez antygeny guza w zaawansowanych morfologicznie zmianach nowotworowych. Wzrost inwazyjności raka płaskonabłonkowego krtani, korelujący ze zmniejszonym wydzielaniem IL-6 i IFN- $\gamma$  przez komórki krwi obwodowej zaangażowane w procesy immunologiczne, może być spowodowany zaburzeniem funkcji tych komórek, wywołanym postępującym wraz z rozwojem choroby nowotworowej brakiem lub zmniejszonym działaniem wymienionych cytokin. Obniżenie efektywności lub hamowanie mechanizmów zależnych od IL-6 i IFN- $\gamma$  wiąże się m.in. ze spadkiem aktywności limfocytów T rozpoznających antygen, upośledzeniem różnicowania pobudzonych przez antygen limfocytów T w kierunku limfocytów cytotoksycznych Tc, zmniejszeniem aktywacji limfocytów Tc i komórek NK mających zdolność do bezpośredniego hamowania proliferacji komórek nowotworowych oraz działania cytolytycznego [46, 47].

Oslabiona produkcja IFN- $\gamma$  może być także spowodowana hamowaniem przez duże stężenie IL-10, wydzielanej głównie przez limfocyty Th2/Tc2, dominującą subpopulację we krwi krążącej u chorych na nowotwory [48]. Zwiększony stopień inwazji nacieku nowotworowego oraz progresja zmian nowotworowych, korelujące ze wzmożoną produkcją IL-10, wiążą się z nasileniem supresyjnych mechanizmów regulacyjnych, zależnych od tej interleukiny, m.in. hamowaniem ekspresji cząsteczek MHC klasy II na makrofagach, co prowadzi do zmniejszenia prezentacji antygenów nowotworowych, z hamowaniem powstawania limfocytów Th1 pobudzonych przez antygeny guza, blokowaniem działania limfocytów Th1 oraz makrofagów i wytwarzania przez nie cytokin, m.in. IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12 [46, 47].

Wszystkie wymienione mechanizmy przyczyniające się do osłabienia lub braku reakcji obronnej układu odpornościowego na rozwijający się nowotwór sprzyjają zwiększeniu inwazyjności nacieku nowotworowego w raku płaskonabłonkowym krtani. Zwiększone stężenie TNF we krwi obwodowej, obserwowane u pacjentów z guzami nowotworowymi o największej rozległości miejscowej pT4, może

wynikać z autokrynej indukcji wydzielania TNF, jak również zależeć od mechanizmu braku hamowania produkcji tej cytokiny przez IL-6, której małe stężenie we krwi obwodowej zostało potwierdzone w zaawansowanych przypadkach raka krtani. Duże stężenie wydzielanego przez komórki TNF, biorącego udział w procesach odpornościowych w inwazyjnych guzach krtani, potwierdza również znaczenie tej cytokiny jako ważnego elementu odpowiedzi przeciwnowotworowej. Wzmożona produkcja TNF, pomimo narastającej wraz z nasileniem inwazji nowotworowej supresji układu odpornościowego, może wskazywać na próbę mobilizacji mechanizmów immunologicznych, które mogłyby się przyczynić do ograniczenia progresji nowotworu m.in. poprzez wzmaganie proliferacji i różnicowania limfocytów B, para- i autokrynnego oddziaływania na monocyty i makrofagi, chemotaktycznego oddziaływania na makrofagi i neutrofile oraz mediację ich cytotoksyczności, zwiększenie właściwości fagocytarnych neutrofilii oraz bezpośrednie działanie cytotoksyczne i antyproliferacyjne na komórki guza lub indukcję martwicy krwotocnej nowotworu dzięki działaniu prokoagulacyjnemu. Nie należy jednak wykluczać negatywnego działania TNF w zaawansowanym raku krtani poprzez zwiększanie ekspresji cząsteczek adhezyjnych ELAM-1 (*endothelial-leukocyte adhesion molecule 1*) i ICAM-1 (*inter-cellular adhesion molecule 1*), co może się przyczyniać do zwiększonego ryzyka inwazji nowotworowej i powstawania przerzutów [46, 47]. Uzyskane w pracy wyniki oraz dane innych autorów przedstawione w dostępnym piśmiennictwie, dotyczące wzajemnych związków między stężeniem generowanych cytokin a wykładnikami klasyfikacji TNM, nie zawsze są zbieżne. Obserwacje badaczy dowodzą istnienia wielorakich zależności między analizowanymi wskaźnikami immunologiczno-klinicznymi, niedającymi się jednak zdefiniować jednoznacznie, zwłaszcza w niejednorodnej grupie HNSCC, oraz wskazują na konieczność ujednoczenia kryteriów doboru grup badawczych i wyboru materiału biologicznego, jak również indywidualnego podejścia w interpretacji wyników dotyczących danego typu guza nowotworowego do wyciągnięcia wiążących wniosków [36, 43–45, 49–51].

Przegląd piśmiennictwa pozwolił na ukazanie podobieństw i różnic w immunopatologii raka płaskonabłonkowego krtani w porównaniu z innymi HNSCC, wskazując na odmienność i w pewnym stopniu swoistość mechanizmów komórkowej odpowiedzi immunologicznej, uwarunkowanych zapewne odmienną biologią różnych typów HNSCC. Zestawienie wyników badań różnych autorów i rezultatów przeprowadzonych doświadczeń wskazuje na znaczącą rolę cytokin w patogenezie i progresji choroby nowotworowej. Heimdal i wsp. [49, 50], analizując wydzielanie cytokin *in vitro* w przypadkach HNSCC z różnym stopniem inwazyjności zmian, zaobserwowali zmniejszone wydzielanie IFN- $\gamma$  i IL-2 przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, korelujące ze wzrostem inwazyjności guza. Autorzy ci zanotowali także mniejszą aktywność komórek układu odpornościowego i obniżoną zdolność do proliferacji limfocytów T wraz ze wzrostem stopnia klinicznego zaawansowania choroby (S). Wyniki dotyczące IFN- $\gamma$  zostały potwierdzone również w badaniach autorów niniejszej pracy. Sparano i wsp. [51]

wykazali występowanie istotnych zależności stężeń wydzielanych cytokin IL-6 i IL-10 ze stopniem klinicznego zaawansowania guza u pacjentów z HNSCC. Nowotwory regionu głowy i szyi określone w badaniu histopatologicznym jako pT3 i pT4 charakteryzowały się zwiększonym stężeniem badanych interleukin, oznaczonych w osoczu krwi w analizowanej grupie chorych. Wyniki dotyczące roli immunosupresyjnej cytokiny IL-10 w progresji guza nowotworowego okazały się zgodne z wynikami autorów niniejszej pracy i potwierdziły występowanie związku dużego stężenia IL-10 z większą inwazyjnością procesu nowotworowego. Również Karcher i wsp. [52] wskazali na znaczenie IL-10 jako wskaźnika zwiększonej agresywności guza, określonej na podstawie oceny stopnia histologicznego zróżnicowania nowotworu. Lathers i wsp. [45], analizując występowanie związków między wydzielanymi cytokinami w grupie chorych z HNSCC, stwierdzili ujemne korelacje między stężeniem IFN- $\gamma$  a interleukinami IL-2, IL-4, IL-6 oraz IL-10 oznaczonych w osoczu. Autorzy zanotowali jednocześnie, że w zaawansowanych guzach nowotworowych pT4 wzajemne relacje między badanymi cytokinami były znacznie mniej zaznaczone. Jebreel i wsp. [43] także potwierdzili występowanie znamiennej zależności IL-10, oznaczonej w surowicy chorych z HNSCC, od rozległości miejscowej nowotworu. Zwiększone wartości stężenia IL-10, stwierdzone w 40% analizowanych przypadków HNSCC, wiązały się z potwierdzeniem w badaniu histopatologicznym zaawansowanych guzów pT3 i pT4.

Riedel i wsp. [36], analizując stężenie IL-6 w surowicy chorych z HNSCC, wykazali istotny związek zwiększonego stężenia badanej cytokiny i cech klasyfikacji pTNM, wskazując na rolę IL-6 w różnicowaniu i regulacji wzrostu guza nowotworowego. Również Lathers i wsp. [44] potwierdzili znamienne zależności między stężeniami IL-6 i IL-4 a stopniem zaawansowania zmian nowotworowych w badanej grupie HNSCC, określonych wg kryteriów klasyfikacji pTNM. Wnioski przedstawione w cytowanych pracach, związane z analizą znaczenia IFN- $\gamma$  i IL-10 w determinowaniu agresywności HNSCC, są zgodne z obserwacjami odnoszącymi się do badanej grupy raków płaskonabłonkowych krtani.

Rezultaty badań dotyczących oceny roli prozapalnych cytokin IL-6 i IL-8 w progresji zmian nowotworowych w HNSCC przedstawiane w dostępnym piśmiennictwie różnią się jednak od spostrzeżeń autorów niniejszej pracy. Rozbieżności w ocenie znaczenia IL-6 w rozwoju choroby nowotworowej i jej roli w determinowaniu agresywności guza mogą wynikać nie tylko z braku jednolitych kryteriów doboru grup badawczych w cytowanych pracach, różnego materiału biologicznego wykorzystanego w przeprowadzanych badaniach, ale przede wszystkim z faktu, że w większości omawianych prac analizowano stężenia IL-6 i IL-8 generowanych przez komórki nowotworowe badanych HNSCC. Wydzielanie przez komórki nacieku nowotworowego cytokin będących czynnikami promującymi wzrost guza i angiogenezę nie mogło pozostać bez wpływu na wnioski badaczy [23, 33–38]. W dostępnym piśmiennictwie można jednak wskazać prace, w których autorzy nie potwierdzają występowania związków między wydzielanymi cytokinami a cechami kliniczno-morfologicznymi bada-

nych guzów nowotworowych regionu głowy i szyi [44, 53]. Lathers i wsp. [44] nie wykazali znamiennej zależności między stężeniem IL-6 oznaczonej w surowicy pobranej od chorych z HNSCC a parametrami morfologicznymi klasyfikacji TNM. Podobne wnioski przedstawili Chen i wsp. [53]. Badacze ci nie zaobserwowali istotnych korelacji stężeń oznaczanych w surowicy cytokin o właściwościach prozapalnych i angiogennych z cechami pT, pN, stopniem histologicznego zróżnicowania nowotworu, jak również obecnością komórek nacieku zapalnego w utkaniu guza nowotworowego.

Wnioski przedstawiane przez różnych badaczy w cytowanych pracach dowodzą występowania trudno porównywalnych odmienności w mechanizmach regulacji komórkowej odpowiedzi immunologicznej w różnych typach HNSCC oraz konieczności ostrożnej interpretacji uzyskanych wyników w celu właściwej oceny zdolności układu immunologicznego do przeciwdziałania rozwojowi procesu nowotworowego. Przedstawione wyniki dotyczące oceny stężeń badanych cytokin w raku płaskonabłonkowym krtani stanowią głos w dyskusji nad znaczeniem aktywności cytokin w zaawansowaniu i progresji zmian nowotworowych oraz wyborze właściwego postępowania terapeutycznego, a także pośrednio ich roli rokowniczej w badanej grupie chorych.

*Badania zostały przeprowadzone z funduszy MNiSW (N403 04332/2326).*

#### Piśmiennictwo

1. Carracedo DG, Astudillo A, Rodrigo JP, Suarez C, Gonzalez MV. Skp2, p27kip1 and EGFR assessment in head and neck squamous cell carcinoma: prognostic implications. *Oncol Rep* 2008; 20: 589-95.
2. Buyukbayram H, Cureoglu S, Arslan A, Işıkakdogan AR. Prognostic value of PCNA and mutant p53 expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Invest* 2004; 22: 195-202.
3. Kumar B, Cordell KG, D'Silva N, et al. Expression of p53 and Bcl-xL as predictive markers for larynx preservation in advanced laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 134: 363-9.
4. Perez-Ordoñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 2006; 59: 445-53.
5. Pignataro L, Sambataro G, Pagani D, Pruneri G. Clinico-prognostic value of D-type cyclins and p27 in laryngeal cancer patients: a review. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2005; 25: 75-85.
6. Swellam M, El-Arab LR, Adly A. Prognostic value of cell-cycle regulators and cellular biomarkers in laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Biochem* 2008; 41: 1059-66.
7. Ioachim E, Peschos D, Goussia A, et al. Expression patterns of cyclins D1, E in laryngeal epithelial lesions: correlation with other cell cycle regulators (p53, pRb, Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. *J Exp Clin Cancer Res* 2004; 23: 277-83.
8. Micozkadioğlu D, Unal M, Pata YS, Baştürk M, Cinel L. Prognostic value of expression of p53, proliferating cell nuclear antigen, and c-erbB-2 in laryngeal carcinoma. *Med Sci Monit* 2008; 14: 299-304.
9. Morshed K, Skomra D, Korobowicz E, Szymański M, Polz-Dacewicz M, Gołabek W. An immunohistochemical study of cyclin D1 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2007; 127: 760-9.
10. Allen C, Duffy S, Teknos T, et al. Nuclear factor-kappaB-related serum factors as longitudinal biomarkers of response and survival in advanced oropharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 3182-90.
11. Bergmann C, Strauss L, Wang Y, et al. T regulatory type 1 cells in squamous cell carcinoma of the head and neck: mechanisms of suppression and expansion in advanced disease. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3706-15.

12. Bergmann C, Strauss L, Zeidler R, Lang S, Whiteside TL. Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-cultures simulating tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 1429-42.
13. Bose A, Chakraborty T, Chakraborty K, Pal S, Baral R. Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Immunol* 2008; 8: 10-9.
14. Bose A, Ghosh D, Pal S, Mukherjee KK, Biswas J, Baral R. Interferon alpha2b augments suppressed immune functions in tobacco-related head and neck squamous cell carcinoma patients by modulating cytokine signaling. *Oral Oncol* 2006; 42: 161-71.
15. Brocks CP, Pries R, Frenzel H, Ernst M, Schlenke P, Wollenberg B. Functional alteration of myeloid dendritic cells through head and neck cancer. *Anticancer Res* 2007; 27: 817-24.
16. Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL. Imbalance in absolute counts of T lymphocyte subsets in patients with head and neck cancer and its relation to disease. *Adv Otorhinolaryngol* 2005; 62: 161-72.
17. Kuss I, Schaefer C, Godfrey TE, et al. Recent thymic emigrants and subsets of naive and memory T cells in the circulation of patients with head and neck cancer. *Clin Immunol* 2005; 116: 27-36.
18. Nitsch SM, Pries R, Wollenberg B. Head and neck cancer triggers increased IL-6 production of CD34+ stem cells from human cord blood. *In Vivo* 2007; 21: 493-8.
19. Pries R, Wollenberg B. Cytokines in head and neck cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 141-6.
20. Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer* 2005; 92: 913-20.
21. Strauss L, Bergmann C, Szczepański M, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. A unique subset of CD4+CD25high Foxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4345-54.
22. Walsh JE, Lathers DM, Chi AC, Gillespie MB, Day TA, Young MR. Mechanisms of tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol* 2007; 8: 227-38.
23. Pries R, Thiel A, Brocks C, Woldenberg B. Secretion of tumor-promoting and immune suppressive cytokines by cell lines of head and neck squamous cell carcinoma. *In Vivo* 2006; 20: 45-8.
24. Barnett BG, Rüter J, Kryczek I, et al. Regulatory T cells: a new frontier in cancer immunotherapy. *Adv Exp Med Biol* 2008; 622: 255-60.
25. Bergmann C, Strauss L, Zeidler R, Lang S, Whiteside TL. Expansion of human T regulatory type 1 cells in the microenvironment of cyclooxygenase 2 overexpressing head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2007; 67: 8865-73.
26. Boucek J, Mrkvan T, Chovanec M, et al. Regulatory T cells and their prognostic value for patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 426-33.
27. Chang AR, Wu HG, Park CI, Jun YK, Kim CW. Expression of epidermal growth factor receptor and cyclin D1 in pretreatment biopsies as a predictive factor of radiotherapy efficacy in early glottic cancer. *Head Neck* 2008; 30: 852-7.
28. Chikamatsu K, Sakakura K, Yamamoto T, Furuya N, Whiteside TL, Masuyama K. CD4+ T helper responses in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2008; 44: 870-7.
29. Dietz A, Boehm A, Mozet C, Wichmann G, Giannis A. Current aspects of targeted therapy in head and neck tumors. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008; 265: 3-12.
30. Ferris RL, Whiteside TL, Ferrone S. Immune escape associated with functional defects in antigen-processing machinery in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3890-5.
31. Gomas IP, Georgiou A, Giotakis J, et al. The role of host immune response and apoptosis in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2007; 69: 159-66.
32. Loose D, Signore A, Bonanno E, et al. Prognostic value of CD25 expression on lymphocytes and tumor cells in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Biother Radiopharm* 2008; 23: 25-33.
33. Kross KW, Heimdal JH, Olsnes C, Olofsson J, Aarstad HJ. Co-culture of head and neck squamous cell carcinoma spheroids with autologous monocytes predicts prognosis. *Scand J Immunol* 2008; 67: 392-9.
34. Kross KW, Heimdal JH, Olsnes C, Olofsson J, Aarstad HJ. Head and neck squamous cell carcinoma spheroid- and monocyte spheroid-stimulated IL-6 and monocyte chemotactic protein-1 secretion are related to TNM stage, inflammatory state and tumor macrophage density. *Acta Otolaryngol* 2005; 125: 1097-04.
35. Schafer ZT, Brugge JS. IL-6 involvement in epithelial cancers. *J Clin Invest* 2007; 117: 3660-3.
36. Riedel F, Zaiss I, Herzog D, Götte K, Naim R, Hörmann K. Serum levels of interleukin-6 in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2005; 25: 2761-5.
37. Pries R, Nitsch S, Wollenberg B. Role of cytokines in head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; 6: 1195-203.
38. Dong G, Chen Z, Li ZY, Yeh NT, Bancroft CC, Van Waes C. Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin 8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 5911-8.
39. Welkoborsky HJ, Hinni M, Dienes HP, et al. Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 503-10.
40. Aarstad HJ, Heimdal JH, Klementsens B, Olofsson J, Ulvestad E. Presence of activated T lymphocytes in peripheral blood of head and neck squamous cell carcinoma patients predicts impaired prognosis. *Acta Otolaryngol* 2006; 126: 1326-33.
41. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 465-72.
42. Heimdal JH, Kross K, Klementsens B, Olofsson J, Aarstad HJ. Stimulated monocyte IL-6 secretion predicts survival of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2008; 8: 34.
43. Jebreel A, Mistry D, Loke D, et al. Investigation of interleukin 10, 12 and 18 levels in patients with head and neck cancer. *J Laryngol Otol* 2007; 121: 246-252.
44. Lathers DM, Achille NJ, Young MR. Incomplete Th2 skewing of cytokines in plasma of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Hum Immunol* 2003; 64: 1160-6.
45. Lathers DM, Young MR. Increased aberrance of cytokine expression in plasma of patients with more advanced squamous cell carcinoma of head and neck. *Cytokine* 2004; 25: 220-8.
46. Gołąb J, Jakóbiński M, Zagożdżon R, Obłąkowski P. Cytokiny. W: *Immunologia*. Gołąb J, Jakóbiński M, Lasek W i wsp. (red.). PWN, Warszawa 2008.
47. Jakóbiński M, Lasek W. *Immunologia nowotworów*. W: *Immunologia*. Gołąb J, Jakóbiński M, Lasek W i wsp. (red.). PWN, Warszawa 2008.
48. Gattoni A, Parlato A, Vangieri B, Bresciani M, Derna R. Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (1 of 2 parts). *Clin Ter* 2006; 157: 377-86.
49. Heimdal JH, Aarstad HJ, Klementsens B, Olofsson J. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) responsiveness in patients with head and neck cancer in relation to tumour stage and prognosis. *Acta Otolaryngol* 1999; 119: 281-4.
50. Heimdal JH, Aarstad HJ, Olofsson J. Peripheral blood T-lymphocyte and monocyte function and survival in patients with head and neck carcinoma. *Laryngoscope* 2000; 110: 402-7.
51. Sparano A, Lathers DM, Achille N, Petruzzelli GJ, Young MR. Modulation of Th1 and Th2 cytokine profiles and their association with advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 131: 573-6.
52. Karcher J, Reisse C, Daniel V, Herold-Mende C. Cytokine expression of transforming growth factor-beta2 and interleukin-10 in squamous cell carcinomas of the head and neck. Comparison of tissue expression and serum levels. *HNO* 1999; 47: 879-84.

#### Adres do korespondencji

dr hab. med. **Katarzyna Starska**  
I Katedra i Klinika Otolaryngologii  
Uniwersytet Medyczny  
ul. Kopcińskiego 22  
90-150 Łódź  
e-mail: katarzyna.starska@umed.lodz.pl